

NON PEPTIDE MIMETICS BASED ON THE ACTIVE SEQUENCE S42FLLR46 OF THE THROMBIN RECEPTOR FOR THE TREATMENT OF THROMBOSIS AND CANCER

Publication number: GR2000100283

Publication date: 2002-05-09

Inventor: ALEXOPOULOS KONSTANTINOS; VLACHAKOS DIMITRIOS; MARAGKOUDAKIS MICHAEL; MATSOUKAS IOANNIS

Applicant: ALEXOPOULOS KONSTANTINOS; VLACHAKOS DIMITRIOS; MARAGKOUDAKIS MICHAEL; MATSOUKAS IOANNIS

Classification:

- International: A61K31/40; A61P35/00; C07C279/14; C07D207/14; C07D207/335; C07D211/18; C07D295/185; C07K7/06; A61K31/40; A61P35/00; C07C279/00; C07D207/00; C07D211/00; C07D295/00; C07K7/00; (IPC1-7): A61K31/40; A61P35/00; C07C279/14; C07D207/14; C07D207/335; C07D211/18; C07D295/185; C07K7/06

- European:

Application number: GR20000100283 20000817

Priority number(s): GR20000100283 20000817

Also published as:

 GR1003885 (B)

[Report a data error here](#)

Abstract of GR2000100283

The invention relates to novel non peptide compounds (mimetics) based on a thrombin receptor sequence and novel methods for the synthesis of these compounds. These compounds act as agonists or antagonists in a variety of cells including endothelial cells, blood platelets, vascular smooth muscle cells and tumor cells. They are useful in the treatment of thrombosis and cardiovascular diseases and modulation of angiogenesis for cancer treatment or wound healing.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(Alexopoulos et al) ΛΕΡΙΛΗΨΗ ΤΗΣ ΕΦΕΥΡΕΣΗΣ

ΜΗ-ΠΕΠΤΙΔΙΚΟΙ ΜΙΜΗΤΕΣ ΤΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ
S₄₂FLLR₄₆ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΗΣ ΘΡΟΜΒΙΝΗΣ

5

Η εφεύρεση σχετίζεται με νέες μη-πεπτιδικές ενώσεις, οι οποίες βασίζονται σε μια πεπτιδική αλληλουχία του υποδοχέα της θρομβίνης και σε νέες μεθόδους σύνθεσης των ενώσεων αυτών. Οι ενώσεις αυτές δρουν ως αγωνιστές ή ανταγωνιστές σε μια ποικιλία κυττάρων όπως ενδοθηλιακά κύτταρα, αιμοπετάλια, αγγειακά κύτταρα λειών μυϊκών μυών και καρκινικά κύτταρα. Οι ουσίες αυτές είναι χρήσιμες για την αντιμετώπιση της θρόμβωσης και των καρδιοαγγειακών ασθενειών, όπως και για την ρύθμιση της αγγειογένεσης για την θεραπεία του καρκίνου και της επούλωσης των πληγών.

15

20

25

30

PCT/US05/29765

ΤΕΧΝΙΚΟ ΠΕΔΙΟ ΤΗΣ ΕΦΕΥΡΕΣΗΣ

Η εφεύρεση σχετίζεται με νέες μη-πεπτιδικές ενώσεις, οι οποίες βασίζονται σε μια πεπτιδική αλληλουχία του υποδοχέα της θρομβίνης και σε νέες μεθόδους σύνθεσης των ενώσεων αυτών. Οι ενώσεις αυτές δρουν ως αγωνιστές ή ανταγωνιστές σε μια ποικιλία κυττάρων όπως ενδοθηλιακά κύτταρα, αιμοπετάλια, αγγειακά κύτταρα λειών μυϊκών μυών και καρκινικά κύτταρα. Οι υσίες αυτές είναι χρήσιμες για την αντιμετώπιση της θρόμβωσης και των καρδιοαγγειακών ασθενειών, όπως και για την ρύθμιση της αγγειογένεσης για την θεραπεία του καρκίνου και της επούλωσης των πληγών.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ-ΠΡΟΪΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΕΦΕΥΡΕΣΗΣ

Η θρομβίνη είναι μία πολυλειτουργική πρωτεΐνη. Χαρακτηρίζεται δε σαν το ένζυμο-κλειδί που συμμετέχει στην αιμόσταση με πολλούς σημαντικούς τρόπους. Πρώτον, στον καταρράκτη της πήξης του αίματος η θρομβίνη μετατρέπει το ιναδογόνο σε θρόμβο ινώδους, ο οποίος σταθεροποιείται με διασυνδέσεις μεταξύ των μορίων ινώδους. Δεύτερον, η θρομβίνη ενεργοποιεί τα αιμοπετάλια, προκαλώντας συσσωμάτωση και έκκριση και τρίτον μπορεί να προκαλέσει μιτογονικές αντιδράσεις στα αγγειακά κύτταρα των λείων μυών. Η τελευταία ιδιότητα της θρομβίνης είναι σημαντική για την ανανέωση των τραυματίσμένων τοιχωμάτων των αιμοφόρων αγγείων. Επιπλέον, η θρομβίνη επιδρά σε μία μεγάλη ποικιλία κυττάρων όπως τα μακροφάγα, τα μονοκύτταρα και τα λευκοκύτταρα. Τέλος, η θρομβίνη είναι ισχυρός αγγειογενετικός παράγοντας, ρυθμίζοντας έτσι την αύξηση του όγκου και την μετάσταση.

Η θρομβίνη έχει την ικανότητα να προκαλεί κυτταρικές αντιδράσεις όταν αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα της. Υποδοχείς της θρομβίνης από ανθρώπινα αιμοπετάλια, από ινοβλάστες των πνευμόνων ποντικιών και από κύτταρα των λείων μυών αρουραίων κλωνοποιήθηκαν και απομονώθηκαν¹⁻³. Ο ανθρώπινος υποδοχέας της θρομβίνης περιέχει 425 αμινοξέα και παρουσιάζει ένα μεγάλο αριθμό κοινών διομικών χαρακτηριστικών με τους κλασσικούς υποδοχείς που προσδένονται με G πρωτεΐνες. Η θέση διάσπασης της θρομβίνης [LDPR ↓ SFLL] βρίσκεται μεταξύ των αμινοξέων 41 και 42 στον ανθρώπινο υποδοχέα της. Στην συνέχεια, πρωτεολυτική

διάσπαση του υποδοχέα οδηγεί στη δημιουργία μίας νέας N-τελικής αλληλουχίας η υποια αυτοενεργοποιεί τον υποδοχέα της θρομβίνης (*tethered ligand*)⁵ προκαλώντας το έναυσμα κυτταρικών αντιδράσεων^{5,6}.

Μελέτες σε διάφορα κύτταρα έδειξαν πως μικρά συνθετικά πεπτίδια που 5 ξεκινούν με αλληλουχία παρόμοια με αυτήν του “*tethered ligand*”, που βρίσκεται στην C-τελική περιοχή του σημείου διάσπασης ($\text{Arg}_{41} \downarrow \text{Ser}_{42}$), μπορούν να αντιγράψουν τις δράσεις της θρομβίνης και να προκαλέσουν παρόμοια κυτταρικά αποτελέσματα⁷⁻¹⁰. Τέτοιου ειδούς πεπτίδια αναφέρονται ως TRAPs (*Thrombin Receptor Activating peptides*). Με βάση τις παραπάνω μελέτες έχουν προσδιοριστεί 10 με ικανοποιητική ακρίβεια τα δομικά χαρακτηριστικά των TRAPs (και επομένως της N-τελικής περιοχής του υποδοχέα) που είναι απαραίτητα για την ενεργοποίηση του υποδοχέα. Έτσι αντικαταστάσεις ή ‘διαγραφές’ αμινοξέων έξω από την αλληλουχία SFLLR (αμινοξέα 1-5 του διασπασμένου υποδοχέα) δεν παρουσίασαν μεγάλες διαφορές στην βιολογική δραστικότητα του πεπτίδιου, αντίθετα όμως, μέσα στην 15 περιοχή $\text{Ser}-\text{Arg}$ επιτρέπονται μόνο πολύ συντηρητικές αντικαταστάσεις.

Συνθετικά πεπτίδια, στα οποία περιέχεται η δραστική αλληλουχία SFLLR του ενεργού N-τελικού άκρου του υποδοχέα, έχουν βρεθεί ικανά να προκαλούν όλες τις κυτταρικές δράσεις της θρομβίνης στο ίδιο ή τουλάχιστον σε μεγάλο βαθμό. Είναι επίσης γνωστό ότι η εισαγωγή μη-πεπτιδικών μορίων σε ένα πεπτίδιο αυξάνει την 20 συγγένεια πρόσδεσης του υποστρώματος με τον υποδοχέα, λόγω της μικρότερης ευλυγισίας που αποκτά το μόριο. Χρησιμοποιώντας κυκλικά πεπτίδια για τον συνολικό περιορισμό της διαμόρφωσης του πεπτίδιου SFLLR βρέθηκε, ύστερα από 25 NMR μελέτες και μοριακό σχεδιασμό των παραπάνω μορίων, ότι το συγκεκριμένο πεπτίδιο λαμβάνει μια κυκλική διαμόρφωση στο σημείο της αλληλεπιδρασης του με τον υποδοχέα της θρομβίνης¹². Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η κυκλική διαμόρφωση που διευθετεί το SFLLR πεπτίδιο περιλαμβάνει μια τριάδα φαρμακοφόρων ομάδων που αποτελείται από τα πεπτίδια Phe και Arg και από μια πρωτοταγή αμινομάδα^{13,14}. Το μοντέλο αυτό επιβεβαώθηκε επίσης με την χρήση κυκλικών πεπτιδίων που περιείχαν D-αμινοξέα (Phe και / ή Arg) στα οποία η δραστικότητα τους παρέμενε μόνο όταν τις συγκεκριμένα αμινοξέα σχημάτιζαν μεταξύ τους μια συστάδα (και τα δύο L- ή D-αμινοξέα).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Vu, T.-K.; Hung, D.; Wheaton, V.; Coughlin, S. *Cell* 1991, **64**, 1057.
2. Rasmussen, U.; Vouret-Graviari, V.; Jallat, S.; Schlesinger, Y.; Pages, G.;
5 Pavirani, A.; Lecocq, J.-P.; Pouyssegur, J.; Van Obberghen-Schilling, E. *FEBS Lett.* 1991, **288**, 123.
3. Zhong, C.; Hayzer, D.; Corson, M.; Runge, M. *J. Biol. Chem.* 1992, **267**, 16975.
4. Vu, T.-K.; Wheaton, V.; Hung, D.; Charo, I.; Coughlin, S. *Nature* 1991, **353**, 674.
5. Gerszten, R.; Chen, J.; Ishii, M.; Ishii, K.; Wang, L.; Nanovicz, T.; Turck, C.; Vu,
10 T.-K.; Coughlin, S. *Nature* 1994, **368**, 648.
6. Chen, J.; Ishii, M.; Wang, L.; Ishii, K.; Coughlin, S. *J. Biol. Chem.* 1994, **269**, 16041.
7. Chao, B.; Kalkunte, S.; Maraganore, J.; Stone, S. *Biochemistry* 1992, **31**, 6175.
8. Vassallo, R.; Kieber-Emmons, T.; Cichowski, K.; Brass, L. *J. Biol. Chem.* 1992,
15 **267**, 6081.
9. Scarborough, R.; Naughton, M.; Teng, W.; Hung, D. *J. Biol. Chem.* 1992, **267**, 13146.
10. Hollenberg, M.; Yang, S.-G.; Laniyonu, A.; Moore, G.; Saifeddine, M. *Mol. Pharmacol.* 1992, **42**, 186.
- 20 11. Hollenberg, M.; Laniyonu, A.; Saifeddine, M.; Moore, G. *Mol. Pharmacol.* 1993, **43**, 921.
12. Matsoukas, J.; Hollenberg, M.; Mavromoustakos, T.; Panagiotopoulos, D.;
Alexopoulos, K.; Yamdagni, R.; Wu, Q.; Moore, G. *J. Prot. Chem.* 1997, **16**, 113-
131.
- 25 13. Matsoukas, J.; Panagiotopoulos, D.; Keramida, M.; Mavromoustakos, T.;
Yamdagni, R.; Qiao, W.; Moore, G.; Saifeddine, M.; Hollenberg, M. *J. Med. Chem.* 1996, **39**, 3585.
14. Panagiotopoulos, D.; Matsoukas, J.; Alexopoulos, K.; Zebeki, A.;
Mavromoustakos, T.; Saifeddine, M.; Hollenberg, M. *LiPS* 1996, **3**, 233-240.
- 30 15. Adang, A.; Hermkens, P.; Linders, J.; Ottenheijm, H.; Staveren, C. *J. Royal Neth. Chem. Soc.* 1994, **113**, 63-78.
16. Seiler, S.; Peluso, M.; Michel, I.; Goldenberg, H.; Fenton, J.; Rixinger, D.;
Natarajan, S. *Biochem. Pharmacol.* 1995, **49**, 519.

17. Alexopoulos, K.; Fatseas, P.; Melissari, E.; Vlahakos, D.; Smith, J.; Mavromoustakos, T.; Saifeddine, M.; Moore, G.; Hollenberg, M.; Matsoukas, J. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 1033-1041.

18. Seiler, SM.; Goldenberg, HJ.; Michel, IM.; Hunt, JT.; Zavoico, GB. *Biochem. and Biophys. Res. Com.* **1991**, *181*, 636-643.

19. Grand, J.; Turnell, A.; Grabham, P. *Biochem. J.* **1996**, *313*, 353.

20. Scarborough, R.; Teng, W.; Naughton, M.; Rose, J.; Alves, V.; Arfsten, A. *Circulation* **1992**, *86*, 1.

21. Raykal, D.; Schmedtje J.; Runge, M. *Am. J. Cardiol.* **1995**, *75*, 82B.

10 22. Jang, I-K.; Gold, H.; Ziskind, A.; Leinbach, R.; Fallon, J.; Collen, D. *Circulation* **1990**, *81*, 219.

23. Lefkovits, J.; Topol, E. *Circulation* **1994**, *90*, 1522.

24. Fenton, J. *Ann. NY Acad. Sci.* **1986**, *370*, 468.

25. Alexopoulos, K.; Panagiotopoulos, D.; Mavromoustakos, T.; Fatseas, P.; Paredes-
15 Carbajal, M.; Mascher, D.; Mihailescu, S.; Matsoukas, J. *J. Med. Chem.* **2000**, In Press.

ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ ΤΗΣ ΕΦΕΥΡΕΣΗΣ

Η εφεύρεση αφορά νέες μη-πεπτιδικής φύσεως ενώσεις οι οποίες βασίζονται σε μια αλληλουχία του υποδοχέα της θρομβίνης, όπως και μεθόδους για την σύνθεση 5 των νέων αυτών ενώσεων. Οι ενώσεις αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν (με χορηγηση από το στόμα) σαν θεραπευτικά για την αναστολή της αγγειογένεσης και την θεραπεία του καρκίνου. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί σε τέτοιες συγκεντρώσεις 10 των ενώσεων αυτών (~90μM) στις οποίες ο καταρράκτης της πήξης του αίματος και η συσσωμάτωση των αιμοκεταλίων δεν επηρεάζονται.

10

1. Μοντέλο Διαμόρφωσης

Το μοντέλο βιοδραστικής διαμόρφωσης του πεπτιδίου SFLLR, η μικρότερη αλληλουχία αμινοξέων που μιμείται την θρομβίνη, περιγράφεται στο οποίο οι πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων Phe και Arg μαζί με την N-τελική αμινομάδα 15 σηματίζουν μια συστάδα. Οι πλευρικές αυτές αλυσίδες μαζί με τις ενδομοριακές αποστάσεις τους που προκύπτουν από μελέτες NOE προσδιδούν τις φαρμακοφόρες ομάδες για τους μιμητές πεπτιδίων που ενεργοποιούν τον υποδοχέα της θρομβίνης.

2. Ορθολογικός Σχεδιασμός

20

Ο σχεδιασμός των μη-πεπτιδικών μιμητών του TRAP που περιγράφονται στην παρούσα εφεύρεση έγινε ορθολογικά¹⁵ λαμβάνοντας υπόψη τις μέχρι τώρα πληροφορίες σχετικά με την αλληλεπίδραση του tethered ligand με τον υποδοχέα της θρομβίνης. Πράγματι οι πληροφορίες που προέκυψαν από την ανακάλυψη του πρωτεΐνικού υποδοχέα της θρομβίνης, αντικαταστάσεις και διαγραφές αμινοξέων του tethered ligand, κρυσταλλογραφικές και φασματοσκοπικές μελέτες και σχέσεις δομής-δραστικότητας της πρωτοταγούς δομής διαφορετικών TRAPs πεπτιδίων χρησιμοποιήθηκαν για την σύνθεση νέων, βελτιωμένων αναλόγων του TRAP με την εισαγωγή περιορισμών (constraints) στο ενεργό πενταπεπτίδιο P5-NH₂. Αντικατάσταση των αλειφατικών αμινοξέων (Leu) του ενεργού κέντρου του 25 πεπτιδίου P5 με ένα μόριο συγκεκριμένης στερεοχημικής δομής, που περιέχει δύο χαρακτηριστικές λειτουργικές ομάδες (φορέας) μπορεί να αποτελέσει ένα τρόπο σταθεροποίησης του μορίου και ταυτόχρονα ένα τρόπο δοκιμής της ικανότητας του να διευθετήσει την παραπάνω κυκλική διαμόρφωση.

30

3. Νέες Δομές

Μια σειρά ενώσεων σχεδιάστηκαν χρησιμοποιώντας τις πρότυπες ενώσεις "A" και "B" όπως φαίνεται στο Σχήμα 1 και Σχήμα 2.

5

ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΕΦΕΥΡΕΣΗΣ

1. Σύνθεση μη-πεπτιδικών μιμητών του πρωτεϊνικού υποδοχέα της θρομβίνης

1^η Κατηγορία Μιμητών

10 Η πορεία σύνθεσης των ενώσεων που σχεδιάστηκαν με βάση τους επιλεγμένους φορείς της πιπεραζίνης, της 4-αμινομεθυλοπεριδίνης, της (±) 3-αμινοπυρρολιδίνης, της 1,4-φαινυλοδιαμίνης και της ισταμίνης έγινε με παρόμοιο τρόπο και ενδεικτικά παριστάνεται στο Σχήμα 3 η σύνθεση της ένωσης THO7. Η σύζευξη της αμινομάδας (πρωτοταγούς ή δευτεροταγούς) του επιστρώματος με την 15 καρβοξυλομάδα ενός καρβοξυλικού οξέος έγινε εφικτή με την χρήση των HOBr (1-υδροξυβενζοτριαζόλιο) και DCC (δικυκλοεξυλοκαρβοδιϊμίδιο) σε διάλυμα CHCl3. Η αύξηση⁷ της εκλεκτικότητας του ενεργοποιημένου καρβοξυλικού οξέος ως προς την μια από τις δύο αμινομάδες (στην περίπτωση της πιπεραζίνης και του 1,4-διαμινοβουτάνιου), όπως και ως προς την πιο δραστική αμινομάδα (στην περίπτωση 20 της 4-αμινομεθυλοπεριδίνης και της 3-αμινοπυρρολιδίνης) του κάθε φορέα επιτεύχθηκε με περίσσεια της συγκεκριμένης διαμίνης (2-5 γραμμοίσοδύναμα) σε σχέση με το καρβοξυλικό οξύ και με μικρούς χρόνους αντίδρασης (1-3 ώρες). Επιπλέον, μετά το τέλος των αντιδράσεων σύζευξης, η επιθυμητή μονο-υποκατεστημένη διαμίνη απομονώθηκε ύστερα από κατεργασία του διαλύματος της 25 αντίδρασης με 2M HCl, κατεργασία της υδατικής φάσης με 2M NaOH μέχρι pH = 9 και τελικά με εκχύλιση της υδατικής φάσης με CHCl3. Η λήψη ενός και μόνου προϊόντος, μετά την κατεργασία των παραπάνω αντιδράσεων, επιβεβαιώθηκε από το HPLC χρωματογράφημα των παραπάνω ουσιών όπως και από τα ¹³C NMR και ¹H NMR φάσματα τους. Στην περίπτωση των φορέων της 4-αμινομεθυλοπεριδίνης και της 3-αμινοπυρρολιδίνης η αμινομάδα με την μεγαλύτερη δραστικότητα, με την παραπάνω μέθοδο σύζευξης, ήταν η πρωτοταγής. Αυτό επιβεβαιώθηκε από τις χαρακτηριστικές απορροφήσεις που είχαν τα άτομα του άνθρακα στο φάσμα ¹³C NMR των ενώσεων αυτών, π.χ. τις διαφορετικές απορροφήσεις του ατόμου του

άνθρακα των αμιδικών δεσμών CONH ($\delta = 169.5$ ppm) και CON ($\delta = 168.1$ ppm).

Τα N-τελικά προστατευμένα αμινοξέα (γλυκίνη, β-αλανίνη, γ-αμινοβουτυρικό οξύ και ε-αμινοεξανοϊκό οξύ) που χρησιμοποιήθηκαν κατά το στάδιο της δεύτερης σύζευξης του επιστρώματος ενεργοποιήθηκαν και πάλι με HOBr και DCC, σε 5 βασικές συνθήκες (DIEA) και σε μικρό όγκο διαλύματος $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ (9:1). Η σύζευξη των παραπάνω ουσιών ολοκληρώθηκε ύστερα από 18-24 ώρες (παρακολούθηση της αντίδρασης με TLC) σε θερμοκρασία δωματίου. Η Boc-προστατευτική ομάδα (Boc: τριτ-βουτυλοξυκαρβονύλιο) για τα παραπάνω αμινοξέα προτιμήθηκε έναντι της Fmoc-ομάδας (Fmoc: 9-φλουρενυλομεθοξυκαρβονύλιο), 10 αφού κατά την αποπροστασία της τελευταίας η απομάκρυνση της πυεριδίνης ήταν προβληματική. Όπου χρειάστηκε, η Boc-προστασία της αμινομάδας έγινε με την μέθοδο του Boc-ανυδρίτη. Το σπάσμο της Boc-ομάδας επιτεύχθηκε με διάλυση της αντίστοιχης ένωσης σε μίγμα 30% TFA/ CH_2Cl_2 (TFA: τριφθοροξικό οξύ). Συμπύκνωση του παραπάνω διαλύματος και κατεργασία του υπολείμματος με αιθέρα 15 (Et_2O) έδωσε, συνήθως σε κρυσταλλική μορφή, το τριφθοροροξικό άλας του προϊόντος. Όλες οι αντιδράσεις γουανυδιλίωσης έγιναν με το αντιδραστήριο του Bernatowicz (υδροχλωρικό άλας της-1H-πυραζολο-1-καρβοξαμιδίνης) σε ελάχιστο όγκο DMF, άνυδρες συνθήκες και σε θερμοκρασία δωματίου. Οι αντιδράσεις αυτές ολοκληρώθηκαν συνήθως σε 24 ώρες και τα τελικά προϊόντα καθαρίστηκαν με 20 ανακρυστάλλωση από $\text{MeOH}/\text{Ακετόνη}/\text{Et}_2\text{O}$ σε σχετικά καλές αποδόσεις (50-60%).

Όσο αφορά τις ενώσεις που συντέθηκαν με βάση τον φορέα της ισταμίνης, η προστασία της πρωτοταγούν αμινομάδας έγινε με το αντιδραστήριο του Nefkens (N-αιθοξυκαρβονυλοφθαλιμίδιο). Η αντίδραση έγινε μέσα σε τρεις ώρες, σε θερμοκρασία δωματίου και σε διαλύτη THF. Το δεύτερο στάδιο σύζευξης, πάνω 25 στην ήδη προστατευμένη ισταμίνη, ήταν η βενζυλίωση ενός εκ των δύο απόμων αζώτου στον αφωματικό δακτύλιο της ισταμίνης με βενζυλοβρωμίδιο. Η αντίδραση βενζυλίωσης έγινε υπό αυστηρά άνυδρες συνθήκες με υδρίδιο του νατρίου (NaH), σε αποσταγμένο DMF για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Το HPLC χρωματογράφημα και το ^1H NMR φάσμα του προϊόντος έδειξαν την ύπαρξη ενός και 30 μόνο μορίου το οποίο αντιστοιχεί σε αυτό με την λιγότερο στερεοχημική παρεμπόδιση. Η αποπροστασία της φθαλυλομάδας έγινε με 0.2M μεθανολικό διάλυμα υδραζίνης (H_2NNH_2) ενώ η αντίδραση γουανυδιλίωσης έγινε με το αντιδραστήριο του Bernatowicz, όπως περιγράφηκε παραπάνω.

2^η Κατηγορία Μιμητών

Η σύνθεση των μη-πρωτεΐνικών αναλόγων του υποδοχέα της θρομβίνης της 2^η Κατηγορίας έγινε με οργανική σύνθεση σε στερεά φάση, χρησιμοποιώντας την 2-χλωροτριτύλ-χλωρο ρητίνη ως στερεό υπόστρωμα όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.

5 Αρχικά, το C-τελικό άκρο της φαινυλαλανίνης (Phe) προστατεύτηκε ως τριμεθυλοπυριτεστέρας με τριμεθυλοχλωρο-πυρίτο, $(CH_3)_3SiCl$, σε συνθήκες βρασμού για 30 λεπτά σε διάλυμα CH_2Cl_2 . Στην συνέχεια, προστέθηκε τριαιθυλαμίνη (TEA) και τελικά ακολούθησε προσθήκη της ρητίνης (2.27 μεριν. Cl^-/g της ρητίνης) με επιπλέον βρασμό του μίγματος για 1 ώρα. Η πιστοποίηση της 10 σύζευξης της Phe πάνω στην ρητίνη έγινε με το τεστ Kaiser (υποκατάσταση: 0.68). Η προσκολλημένη στην ρητίνη Phe ενεργοποιήθηκε αρχικά με DIC (*N,N*-διισοπροπυλοκαρβοδιιψιδιο) και HOBt και στην συνέχεια, αφού χωρίστηκε σε τρία διαφορετικά αντιδραστηράκια, συζεύχθηκε με τρεις διαφορετικές διαμίνες (πιπεραζίνη, 4-αμινομεθυλοπιπεριδίνη, και 3-αμινοπυρρολιδίνη) σε DMF και υπό την 15 παρουσία βάσης (DIEA). Η προσθήκη του Fmoc-ε-αμινοεξανοϊκού οξέος (2.5 εμεριν.) στο δεύτερο άτομο αζώτου της κάθε διαμίνης έγινε και πάλι με την βοήθεια των μέσων σύζευξης DIC και HOBt, σε βασικές συνθήκες (DIEA) και σε ελάχιστο όγκο DMF. Η αποπροστασία της Fmoc-ομάδας έγινε με προσθήκη διαλύματος 20% πιπεριδίνης/DMF για 30 λεπτά. Η ομάδα της γουνανιδίνης προστέθηκε στην ελεύθερη αμινομάδα της κάθε ένωσης με το αντιδραστήριο του Bernatowicz κατά το τελευταίο στάδιο της σύνθεσης και πριν το σπάσμο της ρητίνης. Η ρητίνη αποχωρίστηκε με κατεργασία του κάθε μίγματος με 10% διαλύματος TFA/ CH_2Cl_2 για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Οι ουσίες MEX5, NEC5 και NAT5 καθαρίστηκαν στην συνέχεια με HPLC με συνολική απόδοση 15-35%.

20

25

2. Βιολογική ΔράσηΠειράματα στο μοντέλο της Αγγειογένεσης

Η διαδικασία της αγγειογένεσης ελέγχεται από έναν αριθμό μεταλλοπρωτεάσων, 30 γνωστές ως MMP πρωτεάσες (matrix-degrading metalloproteinases). Μεταξύ αυτών των πρωτεάσων, η MMP-2 πρωτεάση, γνωστή ως ζελατινάση A ή 72 kDa τύπου IV κολλαγονάση, χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη της επίδρασης των αναλόγων που συντέθηκαν στα κύτταρα. Η ανίχνευση της μεταλλοπρωτεάσης MMP-2 έγινε σε

ζυμογραφήματα με την εμφάνιση μιας κτηλίδας στα 74 kDa. Ενεργοποιηση της MMP-2 πρωτεάσης, π.χ. από την θρομβίνη, συντελεί στην εμφάνιση μιας νέας κτηλίδας στα 62-64 kDa. Η μέτρηση του εμβαδού της κάθε κτηλίδας, μέσω ειδικών προγραμμάτων σε ηλεκτρονικό υπολογιστή, μας δίνει πληροφορίες για το ποσοστό ενεργοποίησης / αναστολής της MMP-2 πρωτεάσης και κατά επέκταση της αγγειογένεσης από τις ουσίες που δοκιμάστηκαν. Οι ενώσεις που έχουν δοκιμαστεί εκτενέστερα για την δράση τους με την ζυμογραφία πηκτής (gel zymography) είναι οι DOL1, DOL2, DOL3 και DOL5. Η επίδραση των ενώσεων αυτών (σε συγκεντρώσεις 90μM και για 24 ώρες) στην ενεργοποίηση της προζελατινάσης A φαίνεται στο Σχήμα 5. Η ένωση DOL5 βρέθηκε να αναστέλλει σε μεγαλύτερο ποσοστό την ενεργοποίηση της προζελατινάσης A.

Το μοντέλο αγγειογένεσης σε in vivo πειράματα στην χοριοαλλαντική μεμβράνη από κοτόπουλα (CAM) δοκιμάστηκε επίσης για τον προσδιορισμό της δραστικότητας των ενώσεων DOL1, DOL2, DOL3 και DOL5. Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων σε αυτό το σύστημα έγινε σύμφωνα με το ποσοστό βιοσύνθεσης / αναστολής των κολλαγονούχων πρωτεΐνων. Τα προκαταρκτικά αποτελέσματα συνοπτικά έχουν ως εξής: Όλες οι ουσίες, με δραστικότερη την ένωση DOL, προκάλεσαν αναστολή των κολλαγονούχων πρωτεΐνων με την ακόλουθη σειρά, $DOL5 >> DOL3 \geq DOL2 \geq DOL1$. Επιπλέον η ένωση DOL5 έδειξε ότι αναστέλλει την βιοσύνθεση κολλαγονούχων πρωτεΐνων όταν στην καλλιέργεια των αιγών τοποθετηθεί και η θρομβίνη ή το δραστικό πεπτίδιο P5.

Πειράματα στο μοντέλο χαλάρωσης της αορτής των αρουραίων

Οι ενώσεις της 2nd Κατηγορίας μιμητών που περιέχουν εκτός από τις φαρμακοφόρες ομάδες της φαινυλαλανίνης και της αργινίνης και μια επιπλέον πρωτοταγή αμινομάδα, δοκιμάστηκαν στο πειραματικό μοντέλο χαλάρωσης της αορτής αρουραίων με ή χωρίς την παρουσία ενδοθηλίου. Έτσι για την ένωση MEX5 (0.1-100 μM) βρέθηκε ότι προκαλεί χαλάρωση της αορτής, παρουσία ενδοθηλίου, κατά 1.5-59%, σε σχέση με την συγκέντρωση (Σχήμα 6). Προσθήκη της L-NAME (300 μM) προκάλεσε ελάττωση της χαλάρωσης κατά 26-28%. Το ποσοστό αυτό αντιρροσωπεύει την συμμετοχή του NO στην χαλάρωση της αορτής. Η ένωση MEX5 προκάλεσε επίσης στις ιδιες συγκεντρώσεις χαλάρωση της αορτής απουσία ενδοθηλίου κατά 1.2-31% (Σχήμα 24). Η ένωση NEC5 (0.1-100 μM) προκάλεσε

χαλάρωση της αορτής, παρουσία ενδοθηλίου, κατά 1.3-42.7% (Σχήμα 6), ενώ κατά την προσθήκη της L-NAME (300 μM) η μέγιστη τιμή της χαλάρωσης ελαττώθηκε κατά 17-18%. Σε αορτή χωρίς την παρουσία ενδοθηλίου η χαλάρωση που προκάλεσε η ένωση NEC5 (1-100 μM) ήταν της τάξης του 2.3-14%. Η ένωση NAT5 (0.1-100 μM) προκάλεσε - μια εξαρτώμενη από την συγκέντρωση - χαλάρωση της αορτής (προ-σύσφιξη της αορτής με 1 μM φαινυλεφρίνης), παρουσία ενδοθηλίου, κατά 1.8-40.7% (Σχήμα 6). Η δράση της ένωσης NAT5 εξαφανίστηκε ύστερα από την προσθήκη του αναστολέα της NO, L-NAME (300 μM). Σε αορτή, απουσία ενδοθηλίου, η ένωση NAT5 (10-100 μM) προκάλεσε μια προσωρινή σύσφιξη κατά 2-10 3%. Συγκριτικά, η ένωση NAT5 ($ED_{50} = 3.65 \pm 0.8 \mu M$) βρέθηκε περίπου οκτώ φορές πιο δραστική από την ένωση NEC5 ($ED_{50} = 26 \pm 1.2 \mu M$) και τέσσερις φορές πιο δραστική από την ένωση MEX5 ($ED_{50} = 13.8 \pm 4.1 \mu M$), έχοντας την μεγαλύτερη συγγένεια ως προς τον ενδοθηλιακό υποδοχέα της θρομβίνης.

15 **Πειράματα Συσσωμάτωσης Αιμοπεταλίων**

Οι ενώσεις που έχουν δοκιμαστεί εκτενέστερα μέχρι τώρα είναι οι DOL1, DOL2, DOL3, DOL5, PET7, THO7, MEX5, NEC5 και NAT5. Όλες οι ενώσεις (0.1-4.0 μM) όταν επωάστηκαν σε πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια δεν προκάλεσαν συσσωμάτωση αιμοπεταλίων, δείχνοντας έτσι στέρηση αγωνιστικής δράσης στα ανθρώπινα αιμοπετάλια. Αντίθετα, όταν οι ίδιες ενώσεις επωάστηκαν με πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια για 4 λεπτά πριν από την προσθήκη θρομβίνης ή του ενεργού πεπτιδίου P5-NH₂, τότε οι ενώσεις αυτές έδειξαν ανταγωνιστική δράση. Όπως χαρακτηριστικά φαίνεται στα Σχήματα 7 και 8, όλες ενώσεις προκάλεσαν μια σημαντική - εξαρτώμενη της συγκέντρωσης - αναστολή της συσσωμάτωσης των αιμοπεταλίων, προκαλούμενη από την θρομβίνη, ακόμα και σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις (0.20 μM). Η ένωση THO7 από την 1^η κατηγορία μιμητών με IC_{50} 0.12μM και η ένωση MEX5 με IC_{50} 0.09μM βρέθηκαν να αναστέλλουν σε μεγαλύτερο βαθμό την συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων, προκαλούμενη από την θρομβίνη (0.25 μM). Ακόμα, όλες οι παραπάνω ενώσεις έδειξαν να αναστέλλουν σημαντικά την συσσωμάτωση αιμοπεταλίων, όταν αυτή προκαλείται από το παπτιδίο P5-NH₂, αλλά όχι όταν προκαλείται από κολλαγονούχες πρωτεΐνες.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι (α) η δράση της θρομβίνης στα αιμοπετάλια γίνεται μέσω του υποδοχέα της, (β) το P5-NH₂ αντιδρά άμεσα με τον υποδοχέα της

θρομβίνης και (γ) οι ενώσεις που δοκιμάστηκαν δεν είχαν κανένα αποτέλεσμα στην προκαλούμενη από το κολλαγόνο συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων, μπορούμε να έρθουμε στο συμπέρασμα ότι οι ενώσεις που δοκιμάστηκαν στο σύστημα συσσωμάτωσης αιμοπεταλίων ασκούν την βιολογική τους δράση μέσω μιας εξειδικευμένης αλληλεπίδρασης τους με τον υποδοχέα της θρομβίνης και όχι μέσω αναστολής κάποιας ενζυμικής δράσης της θρομβίνης ή διέγερσης κάποιου άλλου τύπου υποδοχέα¹⁹.

Η διαφορά μεταξύ της - όμοιας ως προς την θρομβίνη - αγωνιστικής δράσης των παραπάνω ενώσεων στο πείραμα χαλάρωσης της αορτής αρουραίων και της αντιθρομβωτικής δράσης τους σε πλάσμα αιμοπεταλίων, μπορεί να εξηγηθεί αν λάβουμε υπόψη τους παρακάτω παράγοντες. Πρώτον, διαφορετικοί τύποι υποδοχέων της θρομβίνης μπορεί να υπάρχουν σε διαφορετικά γένη. Πράγματι, αιμοπετάλια ανθρώπων και όχι αρουραίων και σκύλων ενέργοιοι οιούνται από SFLLR πεπτίδια¹⁶. Δεύτερον, διαφορετικοί τύποι υποδοχέων της θρομβίνης, όπως και διαφορετικά "μονοπάτια ενέργοιοίστης" μπορεί για εμπλέκονται κατά την διέγερση των αιμοπεταλίων και των ενδιθηλιακών κυττάρων. Κατά αυτό τον τρόπο, παρόμοια αποτελέσματα με τα δικά μας έχουν-αναφερθεί από τον Scarborough για τα Μαρπεπτίδια²⁰. Παρόλα αυτά, η ύπαρξη ενός μορίου το οποίο μπορεί ταυτόχρονα να αναστέλλει την συσσωμάτωση αιμοπεταλίων και να αυξάνει την αγγειοδιαστολή μπορεί να έχει ύψιστο κλινικό ενδιαφέρον. Αυτό γιατί ένα τέτοιο μόριο θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την αποφυγή της επανέμφραξης των αγγείων μετά από μια θρομβολυτική θεραπεία μιας οξείας μυοκαρδιακής νέκρωσης (από θρόμβο), ή μετά από μια στεφανιαία αρτηριακή αγγειοπλασία²¹.

25 3. Θεραπευτικές Προδιαγραφές

Οι αναστολείς του ενεργού κέντρου της θρομβίνης αποτρέπουν τις πιο πολλές δράσεις θρομβίνης, ενώ οι αναστολείς της θρομβίνης, όπως το Argatroban, η ιρουδίνη και τα ιρουδοανάλογα (hirulogs) έχουν φανεί πολύ χρήσιμα για την αποτροπή της θρόμβωσης σε πολλά ζωικά μοντέλα²² και η θεραπευτική χρησιμότητα τους είναι αυτή την στιγμή υπό εξέταση σε κλινικές δοκιμές²³. Παρόλα αυτά, η θρομβίνη εκτελεί μία πληθώρα διαδικασιών ενέργοιωντας έναν αριθμό προπητικών (ενέργοιοίστη του πολυμερισμού του ινοδογώνου, και των παραγόντων V, VIII, IX

και ΧΙΙ) και αντιτηκτικών (ενεργοποίηση της πρωτείνης Σ) λειτουργιών επιπλέον από αυτές που έχουν να κάνουν με τις κυτταρικές αλληλεπιδράσεις που προκαλεί μέσω της πρωτεόλυσης του υποδοχέα της²⁴. Μία ουσία που είναι εξειδικευμένη ως προς τον υποδοχέα της θρομβίνης μπορεί να επιτρέπει τις πηκτικές δράσεις της 5 θρομβίνης. Τέτοιου είδους ουσίες που δρουν σαν ανταγωνιστές του υποδοχέα μπορεί να είναι αποτελεσματικές και πιο ασφαλείς όσο αφορά αιμορραγικές επιπλοκές αφού δεν αναστέλλονται με αυτό τον τρόπο όλες οι δράσεις της θρομβίνης. Παρακάτω περιγράφονται μερικές από τις θεραπευτικές εφαρμογές που μπορεί να έχουν οι ανταγωνιστές του πρωτεΐνικου υποδοχέα της θρομβίνης.

10

1. Καρδιοαγγειακές ασθένειες

Ο ανταγωνιστής του υποδοχέα της θρομβίνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ρύθμιση της αρτηριοσκλήρυνσης και των μυοκαρδιακών εμφραγμάτων για δύο λόγους: Πρώτον, ένας τέτοιος ανταγωνιστής σαφώς ρυθμίζει την λειτουργία των 15 αιμοπεταλίων και πιθανόν δρα συνεργικά με συστατικά σχετικά με την ασπιρίνη, τα οποία χαμηλώνουν την συγκέντρωση των αιμοπεταλίων, προστατεύοντας έτσι αποτελεσματικά από αρχικά και επαναλαμβανόμενα εμφράγματα του μυοκαρδίου. Ο αποδέκτης της θρομβίνης μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί στην ρύθμιση των περιοδικών ισχαιμικών επεισοδίων. Επιπλέον, ένας μιμητής του υποδοχέα της 20 θρομβίνης που δρα ανταγωνιστικά μπορεί να αποδειχθεί χρήσιμος σε ακαριαία μυοκαρδιακά εμφράγματα ή άλλες δυσλειτουργίες που οδηγούν σε υπερπηκτικές καταστάσεις. Ένας ανταγωνιστής του υποδοχέα της θρομβίνης μπορεί επίσης να μειώσει αποτελεσματικά τον σχηματισμό θρόμβων και την πήξη στην περιοχή των κατεστραμμένων κολπικών μυών ή πιθανόν στην θέση της πνευμονικής βαλβίδας.

25

Επιπλέον, ο ανταγωνιστής του υποδοχέα της θρομβίνης πιθανόν να χρησιμεύει στην επιβράδυνση της ανάπτυξης της αρτηριακής πλάκας, όπου η στενή σχέση αγγειακής μυϊκής υπερτροφίας και υπερπλασίας εμφανίζεται να παίζει κάποιο ρόλο. Τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία πιστεύεται ότι παίζουν ρόλο στην όλη διαδικασία είναι επίσης στόχος της δράση της θρομβίνης και κατά επέκταση από 30 των μιμητών του υποδοχέα της θρομβίνης. Πολύ πιθανόν ο σχηματισμός θρομβίνης σε τέτοιες θέσεις του πεθολογικού αγγειακού τοίχου να παίζει ένα μιτογενικό ρόλο (ρόλο στην διαιρεση των κυττάρων). Ο ανταγωνιστικός αποδέκτης θα αναστρέψει αυτή την δράση της θρομβίνης και στα λεία μυϊκά κύτταρα και στα ενδοθηλιακά

κυτταρα.

2. Φλεγμονώδεις ασθένειες

Σε περιοχές φλεγμονής, όπως αυτές που είναι παρούσες σε αρθριτικούς συνδέσμους, η σπελευθέρωση των πρωτεασών, οι οποίες ενεργοποιούν τον αποδέκτη της θρομβίνης, εμφανίζεται να παιζει κάτοιο ρόλο. Εάν η ενεργοποιημένη πρωτεάση είναι η ίδια η θρομβίνη ή άλλη πρωτεΐνη παραμένει ένα αναπάντητο ερώτημα. Αυτό γιατί δεν υπάρχουν ακόμα πληροφορίες για το αν η θρομβίνη μπορεί να ενεργοποιηθεί από πρωτεάση άλλη της θρομβίνης. Για τον λόγο αυτό ένα συστατικό της φλεγμονώδους αντίδρασης μπορεί να συμπεριλάβει τον αποδέκτη της θρομβίνης. Η θρομβίνη μπορεί να προκαλέσει επαναρρόφηση των οστών (bone resorption). Τέτοια δράση είναι σημαντική για την ρύθμιση της παραμορφωτικής αρθρίτιδας. Ένας ανταγωνιστής του υποδοχέα της θρομβίνης μπορεί ενδεχομένως να ρυθμίζει τις φλεγμονώδεις ασθένειες και αν αυτό πράγματι συμβαίνει τότε θα είναι χρήσιμος σαν αντιφλεγμονώδες φάρμακο.

3. Τραυματισμοί και επούλωση τραυμάτων

Σε περιπτώσεις τραυματισμών ή χειρουργικών τομών θα αποτελούσε πλεονέκτημα η επιτάχυνση της θεραπείας (ταχεία επούλωση). Η επιτάχυνση της θεραπείας των πληγών είναι πολύτιμη στην περίπτωση δωρητών δέρματος για θεραπεία ασθενών με εγκαύματα και στην θεραπεία οφθαλμικών τραυμάτων. Δεν είναι απίθανο η ίδια η θρομβίνη, αναγεννημένη στην θέση των τραυμάτων, να παιζει σπουδαίο ρόλο στην πορεία της θεραπείας. Στις περισσότερες καταστάσεις είναι επιθυμητή η επιτάχυνση της πορείας της θεραπείας, αντίθετα, σε μερικές περιπτώσεις, είναι επιθυμητή η καθυστέρηση της θεραπευτικής αγωγής προκειμένου να αποφευχθούν ανεπιθύμητες παρενέργειες.

Έτσι σε καταστάσεις τραυματισμών και επανορθώσεως του μτού αποδεικνύεται χρήσιμο να έχουμε διαθέσιμο ένα αγωνιστή ή ανταγωνιστή του υποδοχέα της θρομβίνης, ανάλογα με την περίπτωση. Η χρήση μη-υποβιβασμένων δραστικών αναλόγων του αποδέκτη της θρομβίνης μπορεί να αποδειχθεί πολύ σημαντική για την θεραπεία ανθρώπων, όπως και για την ικτηνιατρική ιατρική. Μία τέτοια ουσία μπορεί επίσης να αποδειχθεί χρήσιμη στην θεραπεία του δωδεκαδάκτυλου, ειλεού και στο έλκος του παχέος εντέρου.

4 Καρκίνος

Στον σχηματισμό του όγκου, η αγγειογένεση και η μετάσταση είναι καθοριστικοί παράγοντες. Υπάρχει υποψία ότι η ενεργοποίηση του υποδοχέα της θρομβίνης στην περιοχή ενός υπό ανάπτυξη όγκου μπορεί να παιζει ρόλο και στην 5 αγγειογένεση και στην μετάσταση. Αυτό δεν είναι εύκολο να ελεγχθεί αφού ένας αριθμός παραγόντων ανάπτυξης του παραγόμενου όγκου μπορεί να συνεισφέρει ταυτόχρονα στην μετάσταση και στην αγγειογένεση. Παρόλα αυτά, η παραγωγή της εξωτερικής πρωτεάσης από καρκινικά κύτταρα και η ικανότητα αυτών των πρωτεασών να ενεργοποιούν δυναμικά τον υποδοχέα της θρομβίνης μπορούν αμέσως 10 να συνεισφέρουν στην παθοφυσιολογία της διάδοσης του όγκου και στην αγγειοποίηση του. Ανεξάρτητα από αυτά τα άμεσα αποτελέσματα του όγκου είναι γνωστό ότι άτομα με όγκο μπορεί να υποφέρουν από υπερπηκτικές καταστάσεις και πιθανόν από διάσπαρτη ενδοαγγειακή πήξη. Έτσι, από την άποψη της αγγειογένεσης, μετάστασης και τα μακρινά αποτελέσματα ενός όγκου σε έναν καρκινοπαθή είναι 15 πιθανόν ένας αντιεγωνιστής του υποδοχέα της θρομβίνης να έχει κάποια σημαντική δράση.

20

25

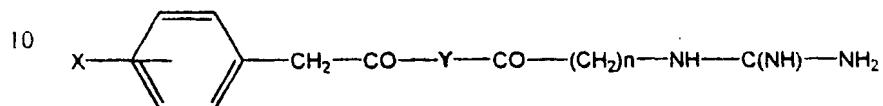
30

ΑΞΙΩΣΕΙΣ1. Μοντέλο Διαμόρφωσης

Το μοντέλο βιοδραστικής διαμόρφωσης του πεπτιδίου SFLLR στο οποίο οι πλευρικές 5 αλυσιδές των αμινοξέων Phe και Arg μαζί με την N-τελική αμινομάδα σχηματίζουν μια ενεργή συστάδα.

2. Νέοι μη-πεπτιδικοί TRAP μιμητές με δύο φαρμακοφόρες ομάδες

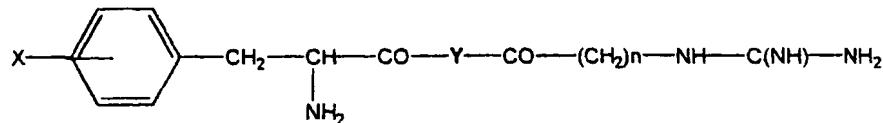
Οι ενώσεις που συντέθηκαν με την παρακάτω δομή



όπου $X = H, F$, $Y = \text{πιπεραζίνη, 4-αμινομεθυλο-πιπεριδίνη, 3-αμινοπυρρολιδίνη, ισονιπεκοτικό οξύ, 1,4-διαμινοβενζόλιο, ισταμίνη και } n = 1, 2, 3, 5.$

3. Νέοι μη-πεπτιδικοί TRAP μιμητές με τρεις φαρμακοφόρες ομάδες

Οι ενώσεις που συντέθηκαν με την παρακάτω δομή

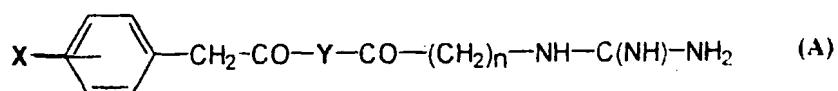


όπου $X = H, F$, $Y = \text{πιπεραζίνη, 4-αμινομεθυλο-πιπεριδίνη, 3-αμινοπυρρολιδίνη, ισονιπεκοτικό οξύ, παριδινογλυκίνη και } n = 1, 2, 3, 5.$

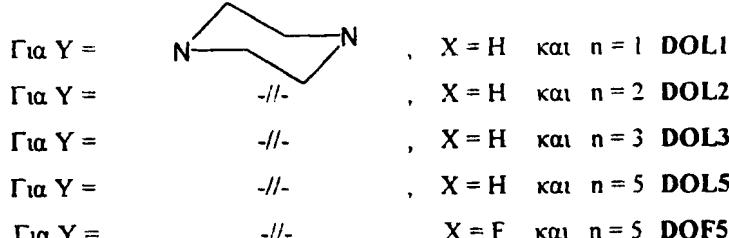
4. Βιολογική εκτίμηση των TRAPs μιμητών

Οι παραπάνω ενώσεις βρέθηκαν να δρουν ως ανταγωνιστές της αγγειογένεσης στο 25 σύστημα CAM και να αναστέλλουν και την ενεργυποίηση της προζελατινάστης A (MMP-2). Οι ενώσεις αυτές βρέθηκαν επίσης δραστικές στο σύστημα χαλάρωσης της αορτής αρουραίων και στο σύστημα συσσωμάτωσης ανθρώπινων αιμοπεταλίων. Τα παραπάνω προϊόντα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή σκευασμάτων για την αντιμετώπιση του καρκίνου, της θρόμβωσης και των 30 καρδιοαγγειακών ασθενειών.

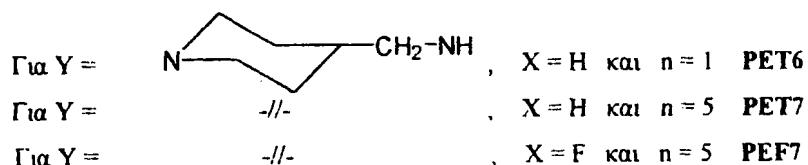
5



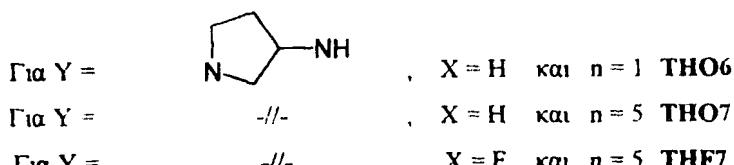
10



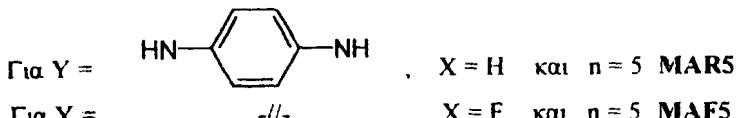
15



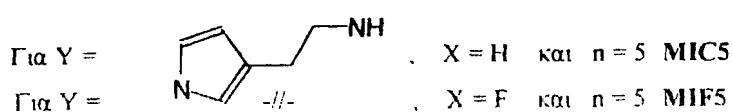
20



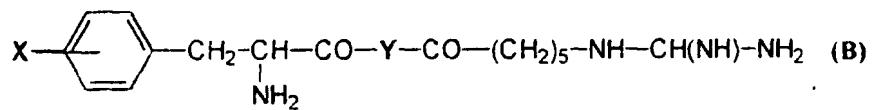
25



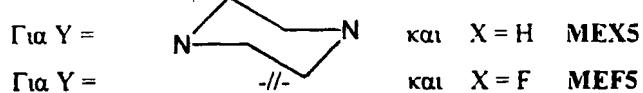
30



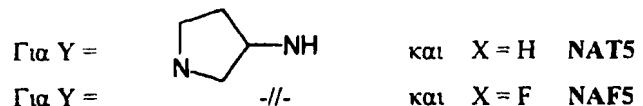
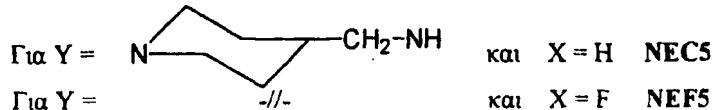
5



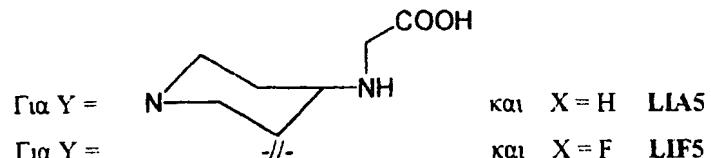
10



15



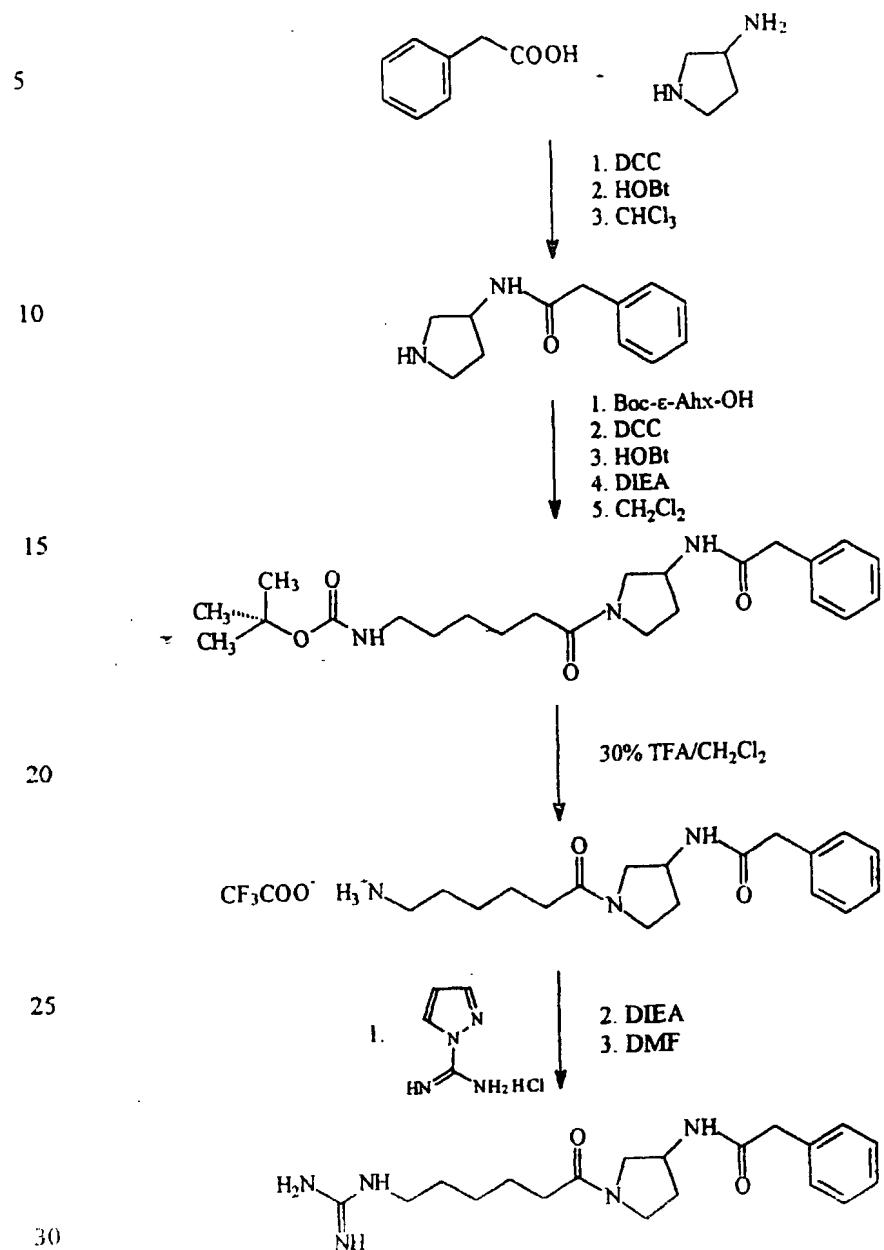
20

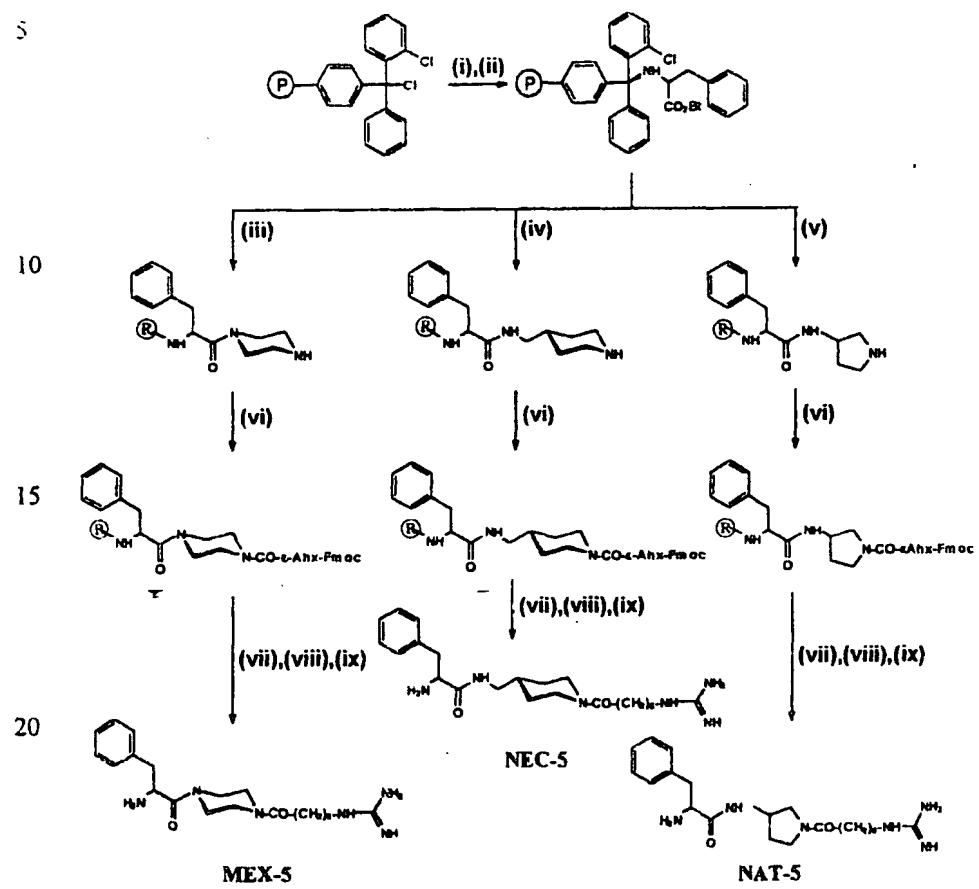


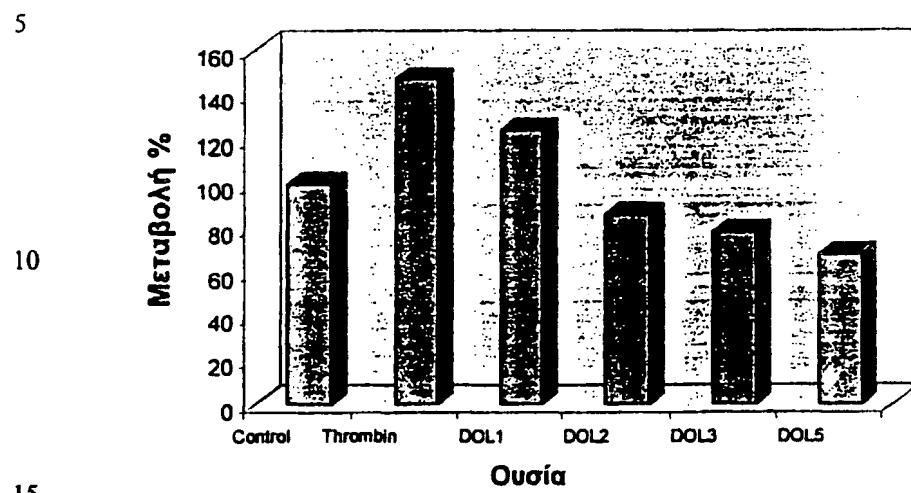
Σχήμα 2

25

30







15

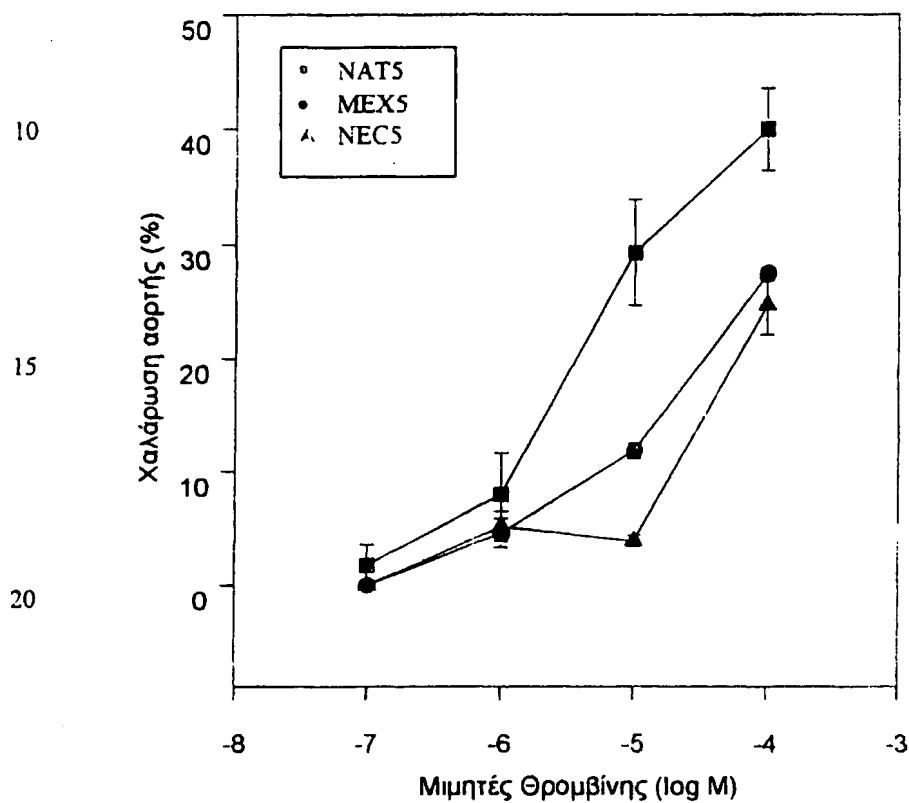
20

25

30

Σχήμα 5

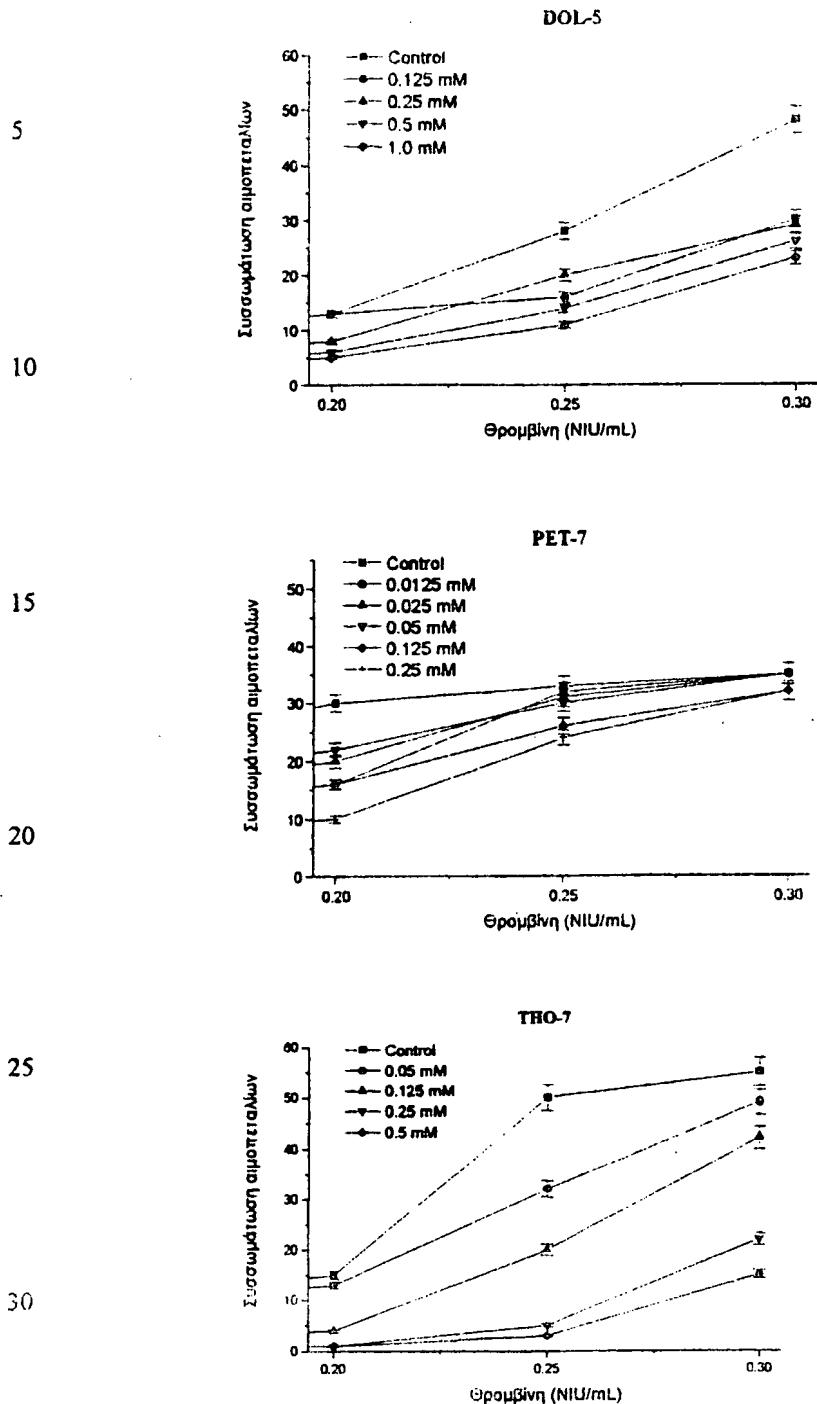
5



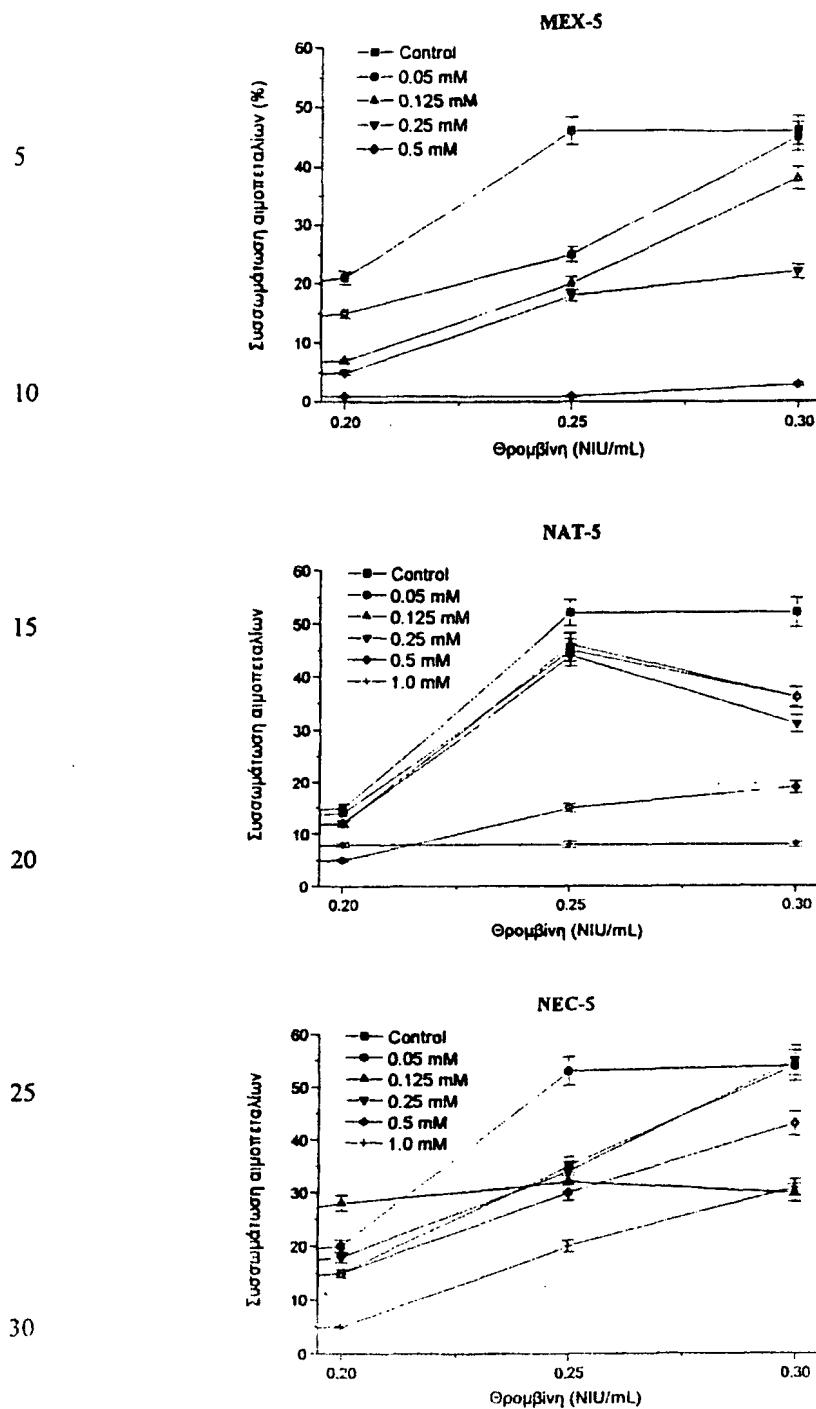
25

Σχήμα 6

30



Σχήμα 7



ΕΚΘΕΣΗ ΕΡΕΥΝΑΣ

Αριθμ. αιτ. ΔΕ : 20000100283

Αριθμ. ΔΕ : 1003865



Κατηγ.	ΣΧΕΤΙΚΑ ΕΓΓΡΑΦΑ & αναφορές σε τμήματά τους	Σχέση με αέισηση	Διεθν. Ταξινόμηση Int. Cl. ⁷
	Η γρανιτα βασίστηκε σε έγγραφα που κατατέθηκαν μετα το 1978. Ειδικώτερα, εγινε: σε δημοσιευμένες Ευρωπαϊκές Διεθνείς & Αμερικανικές αιτήσεις ΔΕ, σε κεριλήψεις στην ιταλική Γιαπωνέζικων αιτησων ΔΕ & σε Ελληνικές αιτησιες ΔΕ με προτεραιότητα. Πάντως, αυτα ονταν να αναφερθηκαν στην Εκθεση Ερευνας και έγγραφα που πελέν των αναφερομένων.		
X	ALEXOPOULOS, KOSTAS ET AL : "Synthesis and biological activities of thrombin receptor derived non peptide mimetics : importance of phenyl / /guanidino proximity for activity" PEPT. 1998, PROC. EUR. PEPT. SYMP., 25TH (1999), MEETING DATE 1998. EDITOR(S): BAJUSZ, SANDOR, HUDECZ, FERENC, PUBLISHER : AKADEMIAI KIADO, BUDAPEST, HUNG., σελίδες 650-651, XP001015506 * ολόκληρο το έγγραφο *	1,2,4	C07D 295/185 A61K 31/40 A61P 35/00 C07C 279/14 C07D 207/14 C07K 7/06 C07D 211/18 C07D207/335
A		3	
X	ALEXOPOULOS, KOSTAS ET AL : " Design and synthesis of thrombin receptor-derived nonpeptide mimetics utilizing a piperazine scaffold" BIOORG.MED.CHEM. (1999), 7(6), 1033-1041, XP001010695 * σελίδα 1033 – σελίδα 1034 *	1,2,4	Τεχνικά πεδία που ερευνήθηκαν C07D C07C A61K A61P C07K
A		3	
X	MISSIRLIS, ELEFTHERIA ET AL: "Peptidomimetic thrombin receptor analogs : effects on angiogenesis and metalloproteinase activation in endothelial cells" BIOMED. HEALTH RES. (1999), 22 (BIOACTIVE PEPTIDES IN DRUG DISCOVERY AND DESIGN : MEDICAL ASPECTS), 71-79. XP001015504 * σελίδα 72 – σελίδα 73 *	1,2,4	
A	-/-	3	

Ημερομηνία ολοκλήρωσης της Εκθεσης Ερευνας : 21 Σεπτεμβρίου 2001

X : έγγραφο πολύ σχετικό
Y : έγγραφο πολύ σχετικό σε συνδιασμό⁸
Λ : περιολογικό υπόβαθρο
Ο : μη γραπτή αποκάλυψη
Ρ : ανδιάμεσο έγγραφο
& : μέλος της ίδιας οικογένειας εφευρύσεων

T : θεωρία ή αρχή της βάσης της εφεύρεσης
Ε : προγενέστερο έγγραφο ΔΕ που δημοσιεύτηκε με άλλο έγγραφο της ίδιας κατηγορίας κατά ή μετά την ημερομηνία κατάθεσης
D : έγγραφο αναφερόμενο στην αίτηση
L : έγγραφο αναφερόμενο για άλλους λόγους

ΕΚΘΕΣΗ ΕΡΕΥΝΑΣ

Αριθμ. αιτ. ΔΕ : 20000100283

Αριθμ. ΔΕ : 1003885

Κατηγ.	ΣΧΕΤΙΚΑ ΕΓΓΡΑΦΑ & αναφορές σε τμήματά τους	Σχέση με αξίωση	Διεύθ. Ταξινόμηση Int. Cl. ¹
X	<p>Η ερευνη ήταν στηριζόμενη σε έγγραφα που κατατέθηκαν μετα το 1978. Ειδικωτέρως, εγνε σε δημοσιευμένες Ευρωπαϊκες, αμερικανικές & Αμερικανικές αιτήσεις ΔΕ, σε περιήγηση στην αγγλική Γιαπωνέζικων αιτησαν ΔΕ & σε Ελληνικές αιτησας ΔΕ με προτρομιστήτα. Πάντως, πινακίδες στην έρευνη δεν αναφέρονται στην Εκθεση Ερευνας και έγγραφα σπουδαίων πων αναφερομένων.</p>		
X	<p>ALEXOPOULOS KOSTAS ET AL : "A comparative SAR study of thrombin receptor derived non peptide mimetics. Importance of phenyl/guanidine proximity for activity" AMINO ACIDS (1998), 15(3). 211-220. XP001010683 * σελίδα 212 – σελίδα 213 *</p>	1.2.4	
A		3	
X	<p>DATABASE CA "On line ! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE,COLUMBUS, OHIO, US , MATSOUKAS, JOHN ET AL : "Conformational analysis of the thrombin receptor agonist peptides SFLLR and SFLLR-NH2 by NMR : evidence for a cyclic bioactive conformation" retrieved from STN Database accession no. 126:340655 XP002177980 * περιληψη * & J. PROTEIN CHEM. (1997), 16(2). 113-131</p>		Τεχνικά πεδία που ερευνήθηκαν
T	<p>ALEXOPOULOS, KOSTA ET AL : "Design, Synthesis, and Modeling of Novel Cyclic Thrombin Receptor-Derived Peptide Analogues of the Ser42-Phe-Leu-Leu-Arg46 Motif Sequence with Fixed Conformations of Pharmacophoric Groups : Importance of a Phe/Arg/NH2 Cluster for Receptor Activation and Implications in the Design of Nonpeptide Thromb" J. MED. CHEM. (2001), 44(3), 328-339, XP002177978 * σελίδα 328 – σελίδα 329 *</p>	1-4	

Ημερομηνία ολοκλήρωσης της Εκθεσης Ερευνας : 21 Σεπτεμβρίου 2001

X : έγγραφο πολύ σχετικό
Y : έγγραφο πολύ σχετικό σε συνδυασμό²
A : τεχνολογικό υπόβαθρο
O : μη γραπτή αποκάλυψη
P : ενότιμεσσο έγγραφο
& : μέλος της ίδιας οικογένειας αφευρέσαν

T : θωριδή αρχή της βάσης της εφεύρεσης
E : προγενέστερο έγγραφο ΔΕ που δημοσιεύτηκε με
άλλο έγγραφο της ίδιας κατηγορίας κατά ή μετά
την ημερομηνία κατάθεσης
D : έγγραφο ανανεωρόμενο στην αιτηση
L : έγγραφο αναφερόμενο για άλλους λόγους